

醋酸戈舍瑞林微球的体内外相关性研究

王梦迪¹, 薛英², 冷广意², 许丽晓^{1,2}, 闫静静², 余飞^{1,2}, 杨化新³, 刘万卉^{1,2*}

(1. 烟台大学药学院, 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心、分子药理学和药物评价教育部重点实验室, 山东烟台 264005; 2. 山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 山东烟台 264670; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 本研究的目的是对注射用醋酸戈舍瑞林微球建立体内外相关性 (*in vitro-in vivo* correlation, IVIVC)。制备了3种释放速率不同的注射用醋酸戈舍瑞林微球, 并对其物理化学性质进行了表征; 采用恒温水浴振荡法测定了3种微球的体外释放度曲线并研究了在该条件下的释放机制; 以SD大鼠为动物模型, 研究3种微球在体内的药代动力学特性, 药代动力学实验方案经山东绿叶制药有限公司动物伦理委员会批准实施; 血药浓度-时间曲线经% AUC法处理后得到体内累积释放曲线, 并与体外累积释放曲线进行相关性分析。结果表明, 本文开发的体外释放度测定方法对不同的醋酸戈舍瑞林微球具有良好的区分能力, 醋酸戈舍瑞林微球的体内外相关性良好 ($r > 0.98$), 并在SD大鼠体内具有良好的预测能力。

关键词: 醋酸戈舍瑞林; 微球; 体外释放度曲线; 药代动力学; 体内外相关性; 预测能力

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0159-07

In vitro-in vivo correlation of goserelin acetate microspheres

WANG Meng-di¹, XUE Ying², LENG Guang-yi², XU Li-xiao^{1,2}, YAN Jing-jing²,
YU Fei^{1,2}, YANG Hua-xin³, LIU Wan-hui^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. State Key Laboratory of Long-acting and Targeting Drug Delivery System, Shandong Luye Pharmaceutical Co. Ltd, Yantai 264670, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: The objective of this paper was to establish a level A *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) for goserelin acetate extended release microspheres for injection. Three kinds of goserelin acetate microspheres with different release rates were prepared and the critical physicochemical properties, such as drug loading, particle size, glass transition temperature and morphology were characterized. *In vitro* dissolution test of the prepared goserelin acetate microspheres was performed using sample-and-separate method at 45 °C in 5% (v/v) methanol. The morphology of the microspheres and the molecular weight of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) of the prepared goserelin acetate microspheres were investigated to research the release mechanism of microspheres. The plasma concentration of goserelin was detected after intramuscular injection of goserelin acetate microspheres to SD rats, and correlated with the *in vitro* release profiles after processing by percent AUC method. The pharmacokinetic experimental protocol of goserelin acetate microspheres for injection in SD rats was approved by the Animal Ethics Committee of Shandong Luye Pharmaceutical Co., Ltd. The results indicated that the developed sample and separate method was able to detect differences in the release characteristics of the prepared goserelin acetate microspheres, and the

收稿日期: 2018-09-17; 修回日期: 2018-10-18.

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2017ZX09101001).

*通讯作者 Tel: 86-535-3946176, E-mail: wanhui@luye.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0859

in vitro-in vivo correlation of goserelin acetate microspheres was excellent ($r > 0.98$) and had good predictive ability in SD rats.

Key words: goserelin acetate; microsphere; *in vitro* release profile; pharmacokinetics; *in vitro-in vivo* correlation; predictive ability

可生物降解的聚合物微球作为一种储库型释药系统, 由于其骨架材料具有良好的生物相容性和生物可降解性, 能增强蛋白类药物的稳定性, 降低毒副作用, 延长药物释放时间, 减少给药频次, 改善患者依从性, 在过去几十年引起了广泛的关注^[1-5], 并有多个产品上市。然而, 制备工艺微小的变化都可能改变聚合物微球的关键质量参数, 这有可能改变药物在体内的释放特性^[6], 从而产生严重的不良反应和毒性。释药行为是新型释药系统(如口服缓控释制剂、微球、纳米粒等)的重要质量属性, 良好的体外释放度方法既可用于产品的质量控制在反映药物在体内释放性能以确保产品的有效性和安全性^[7,8], 较体内释放度测定更适于制剂释药行为的评价。体外释放度方法能代替体内方法进行制剂评价的前提是体外释放度方法能较好地反映制剂在体内的释药行为, 即具有体内相关性(*in vitro-in vivo* correlation, IVIVC)。FDA 药品评价和研究中心(CDER)将 IVIVC 定义为: 描述某一药物缓控释制剂的体外特征(通常是药物的体外释放速率或释放程度)与体内反应(如血浆药物浓度或吸收的药物量)之间相关关系的一种预测性的数学模型^[9]。IVIVC 分为 4 个等级: A 级相关程度最高, 是体内释放过程与体内响应过程之间的点对点关系; B 级是将体外释放时间平均值与滞留时间平均值或体内释放时间平均值进行比较, 此类相关性不属于点对点关系; C 级为体外释放度参数(如 $t_{50\%}$, $t_{90\%}$)与药动学参数[血药浓度时间曲线下面积(AUC)、 t_{max} 、 C_{max}]之间的单点对应关系; 多重 C 级为将 1 个或多个药代动力学参数与释放度曲线中几个时间点的药物释放量相联系的一种对应关系^[6]。IVIVC 的建立, 可以在药物开发的各个阶段指导处方筛选以及工艺变更, 有助于制定释放度限度以确保产品的质量, 若成功建立 A 级 IVIVC, 就可豁免生物等效性研究, 减少人体和动物实验数量, 同时减轻监管的压力^[10-12]。

不同于传统的口服固体制剂, 对注射用缓释制剂建立 IVIVC 存在诸多困难, 例如, 释放机制复杂, 通常存在两个或 3 个释放阶段, 体内药代动力学曲线的去卷积计算及模型的建立存在困难^[3]; 给药方式通常为皮下或肌肉注射, 酶催化或炎症反应的发生使得药物在体内外的释放机制有所不同^[4,13]; 没有标准的体外

释放度测定方法, 不能很好地模拟药物在体内的释放行为等^[5]。因此, 文献^[3,6]中仅报道了对利培酮和纳曲酮(小分子药物)聚合物微球建立了 A 级 IVIVC。

为了研究是否能对注射用醋酸戈舍瑞林微球建立 IVIVC, 本文制备了 3 种释放速率不同的醋酸戈舍瑞林微球, 以 SD 大鼠为动物模型, 进行了体内相关性研究, 最终建立了醋酸戈舍瑞林微球的 A 级 IVIVC 模型。

材料与方法

主要仪器 Agilent1260 系列高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司); EM-30 Plus 型扫描电镜(韩国库萨姆公司); DSC822E 型差示扫描量热仪(瑞士 Mettler Toledo 公司); Masterizer 2000 激光粒度仪(英国马尔文公司); QTRAP5500 质谱仪(美国 ABSciex 公司)。

药品与试剂 醋酸戈舍瑞林(瑞士 Bachem 公司, 批号: 1068468); 戈舍瑞林-D10(印度 Clearsynth 公司, 批号: CS-GR-102); PLGA 5050(山东绿叶制药有限公司, 批号: LY1180045); 甲醇(色谱纯, 批号: SJ6SF66957)、乙腈(色谱纯, 批号: DI6DF66786)、四氢呋喃(色谱纯, 批号: I0891701720)均购于德国 Merck 公司; Tween 20(化学纯, 批号: 20170323)、二氯甲烷(色谱纯, 批号: 20170402)、聚乙烯醇(PVA, 批号: 20160203)均购于国药集团化学试剂有限公司; 乙酸(色谱纯, 美国 TEDIA 公司, 批号: 17060467); 甲酸(色谱纯, 美国 Anaqua Chemicals Supply 公司, 批号: 73C1606TD)。

动物 雄性 SD 大鼠(济南朋悦实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(鲁)2014-0007), 体重: 220~250 g。

醋酸戈舍瑞林微球的制备 采用复乳法(S/O/W 法)制备醋酸戈舍瑞林微球。具体制备步骤如下: 取 PLGA 2 g 溶于 8 mL 二氯甲烷中, 磁力搅拌使之完全溶解作为油相。将醋酸戈舍瑞林原料药加入到油相中, 在 $11\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下高速分散制成 S/O 型初乳。将 PVA(1%, v/v) 溶液 1 L 预冷至 $8\ ^\circ\text{C}$ 后置于均质机上, 在 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 注入初乳并乳化 4 min, 制成 S/O/W 型复乳。将制备的复乳低速搅拌 4 h, 挥发有机溶剂, 将微球过 150 目筛后用蒸馏水冲洗 4 次, 于真空冷冻干燥机中冻干即得。

微球的表征

载药量 取醋酸戈舍瑞林微球 20.0 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加 2 mL 乙腈超声使之溶解, 用 0.1% (v/v) 醋酸稀释至刻度, 摇匀。取该溶液约 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 以 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液作为供试品溶液, 用 HPLC 测定戈舍瑞林浓度。色谱条件为色谱柱: Ultimate XB-C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 流动相: 0.5% 磷酸水-0.5% 磷酸乙腈 (75:25, v/v); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 检测波长: 220 nm。按照下式计算微球载药量: $DL = W_D / W_M \times 100\%$, 其中 DL 为微球载药量, W_D 为微球中总药量, W_M 为微球总量。

粒度 将微球分散在 0.1% Tween 20 中, 用马尔文 2000 粒度仪进行粒度测定。

玻璃化转变温度 (T_g) 使用示差扫描量热法 (DSC) 测定醋酸戈舍瑞林微球 T_g 。取适量微球于铝坩埚中, 压盖密封, 在 0~100 °C 内, 升温速率 10 °C·min⁻¹ 的条件下测定, 每个样品测两次, 取第 2 次结果进行分析。

形貌分析 使用扫描电镜 (SEM) 对制备的醋酸戈舍瑞林微球的形貌进行表征。将醋酸戈舍瑞林微球涂布在粘有导电胶的样品座上, 对样品进行喷金处理。将处理好的样品用 SEM 进行分析。

体外释放度研究 采用恒温水浴振荡法测定醋酸戈舍瑞林微球的体外释放度。称取醋酸戈舍瑞林微球约 20 mg, 置于 25 mL 塑料离心管中, 加入释放介质 5% (v/v) 甲醇水 5 mL, 放入温度为 (45 ± 0.5) °C、转速为 50 r·min⁻¹ 的恒温水浴振荡器中, 在预定的时间间隔精密量取每份溶液 4 mL, 同时补加等体积的释放介质, 取出溶液以 13 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min。离心结束后, 取上清液作为供试品溶液, 用 HPLC 进行测定, 方法同载药量测定。

微球释放机制研究 在体外释放度测定条件下, 分别在不同的时间点取出释放样品, 尽量移除释放介质后 25 °C 真空干燥 12 h, 使用 SEM 观察微球形貌。使用凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定 PLGA 分子量, 具体操作为: 取一套聚苯乙烯分子量标准品, 加入四氢呋喃 1.5 mL, 作为对照品溶液; 取释放过程中微球约 6 mg, 加入四氢呋喃 1.5 mL, 振荡溶解, 作为供试品溶液。色谱条件为: 色谱柱 Styragel® HT3 (300 mm × 7.8 mm, 10 μm, M_w : 500~30 000) 与色谱柱 Styragel® 6E (300 mm × 7.8 mm, 10 μm, M_w : 5 000~60 000) 串联使用; 柱温为 30 °C; 流速为: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积为 20 μL; 检测器为示差折光检测器, 检测器温度为 35 °C, 用凝胶渗透色谱软件计算 PLGA 的 M_w 。

体内药代动力学研究 注射用醋酸戈舍瑞林微

球在 SD 大鼠体内的药代动力学实验方案经山东绿叶制药有限公司动物伦理委员会批准实施。取醋酸戈舍瑞林微球适量, 加入 CMC-Na 溶液配成混悬剂后按 1.8 mg·kg⁻¹ 剂量对 SD 大鼠经肌肉注射给药。分别于给药前及给药后不同时间经大鼠眼球后静脉丛取血, 收集到的血液样品置于肝素化试管中, 4 °C、13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将上清液移至 EP 管中, 分析前将血浆样品置于 -80 °C 冰箱中保存。建立的分析方法按照 CFDA 颁布的《生物样品定量分析方法验证指导原则》进行验证。采用经过方法学考察合格的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法^[14] 测定血浆中戈舍瑞林的浓度。

样品前处理 取大鼠血浆 100 μL 于离心管中, 加入 100 μL 内标溶液 (戈舍瑞林-D10, 10 μg·L⁻¹)、100 μL 甲醇-水 (60:40, v/v)、100 μL 甲醇, 涡旋混合 1 min。上层导入已活化的 HLB 固相萃取柱 (1 cc, 30 mg), 用 1 mL 甲醇-水 (60:40, v/v) 洗杂质, 再用 1 mL 0.01% (v/v) 甲酸甲醇洗脱, 洗脱液置于 50 °C 水浴, 用干燥的氮气流吹干, 再用 100 μL 甲醇-水 (60:40, v/v) 复溶, 涡旋后取 10 μL 进样至液质系统。

色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为甲醇 (A) 和 0.02% (v/v) 甲酸水 (B); 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子化源 (ESI); 极性: 正离子; CE 电压: 30 eV; DP 电压为 40 V; 离子喷射电压: 5 500 V; 温度: 550 °C; 源内气体 1 (N₂) 压力: 50 psi; 气体 2 (N₂) 压力: 50 psi; 气帘气 (N₂) 压力: 30 psi; 碰撞气压力: 8 psi; 用于定量分析的离子反应为: 戈舍瑞林 (635.4/607.3), 内标戈舍瑞林-D10 (640.4/612.5)。

IVIVC 的建立 根据文献报道^[15,16], 将血药浓度-时间曲线经 %AUC 法处理后得到体内累积吸收曲线, 使用梯形面积法计算 AUC, 公式如下:

$$AUC_{(t_1-t_2)} = \left[\frac{c_1 + c_2}{2} \right] \times (t_2 - t_1)$$

$$F_a(t) = (AUC)_t / (AUC)_\infty$$

其中, $F_a(t)$ 为在时间 t 内被吸收的药物的百分数, (AUC) _{t} 为在时间 t 内血药浓度-时间曲线下面积, (AUC) _{∞} 为血药浓度-时间曲线下总面积。以体外累积释放度为自变量, 以体内累积释放度为因变量进行线性回归, 建立 IVIVC 方程, 根据相关系数 (r) 值判断二者相关性^[17]。

统计学方法 采用 SPSS 16.0 程序进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数间比较采用单因素方差分析, 显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

结果与讨论

1 醋酸戈舍瑞林微球的表征

3种释放速率不同的醋酸戈舍瑞林微球的物理化学性质见表1。结果显示,3种微球的载药量相似,均为3.5%左右。制备的3种微球制剂(F、M和S)的粒径见图1A,3种微球的粒径较相似($P>0.05$),均在80~87 μm 。微球制备时所用的高分子PLGA分子量不同,3种微球的玻璃化转变温度略有差异。3种醋酸戈舍瑞林微球的扫描电镜照片见图1B~D,3种微球制剂均呈现良好的球形形态,其中制剂F与制剂M圆整度较好且表面较光滑,而制剂S圆整度较差,表面褶皱较多。

Table 1 Physicochemical properties of the goserelin acetate microspheres with different release rates. $n = 3, \bar{x} \pm s$. M_w : Molecular weight of poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA)); DL: Drug loading; T_g : Glass transition temperature

Formulation	M_w	DL/%	Particle size/ μm	$T_g/^\circ\text{C}$
F	15 000	3.33 ± 0.31	80.79 ± 2.15	40.81
M	20 000	3.44 ± 0.13	86.70 ± 3.16	41.38
S	30 000	3.39 ± 0.07	86.87 ± 3.10	43.24

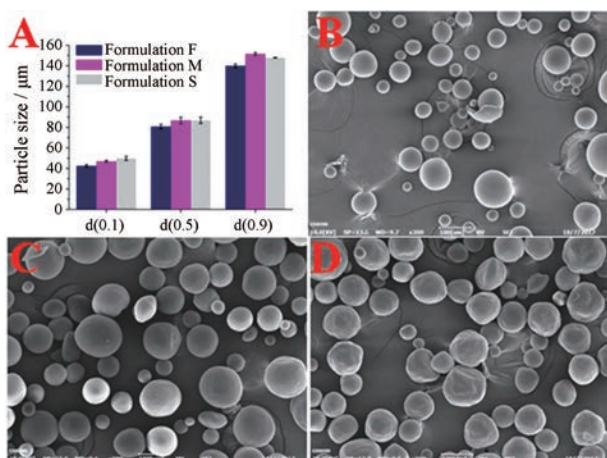


Figure 1 Scanning electron microscope (SEM) micrographs of goserelin acetate microspheres. A: Particle size of the goserelin acetate microspheres with different release rates. $d(0.1)$, $d(0.5)$ and $d(0.9)$ are characteristic values of particle size distribution. B: Formulation F; C: Formulation M; D: Formulation S

2 醋酸戈舍瑞林微球的体外释放曲线

醋酸戈舍瑞林在水中溶解度好,释放介质体积选择为5 mL便可满足漏槽条件;醋酸戈舍瑞林在该介质中稳定性较好,且5% (v/v) 甲醇水溶液为Trelstar® Depot (注射用双羟萘酸曲普瑞林)使用的释放介质^[18],由于戈舍瑞林和曲普瑞林都是十肽组成的促性腺激素释放激素(GnRH)类似物,其释放行为可能具

有相似性。因此,选择5% (v/v) 甲醇水作为释放介质。此外,经过对释放装置和释放温度等影响因素进行考察后,确定使用恒温水浴震荡法,在45 $^\circ\text{C}$ 条件下考察3种醋酸戈舍瑞林微球的体外释放曲线,结果如图2所示。由图可见,3种醋酸戈舍瑞林微球在5% 甲醇水、45 $^\circ\text{C}$ 条件下的释放曲线显示,在释放中后期,3种微球的释放速度为制剂F>制剂M>制剂S,这是因为用于制备醋酸戈舍瑞林微球的PLGA分子量依次增加,随着PLGA分子量的增加,微球降解速率变慢,使得醋酸戈舍瑞林的释放速率减慢,该结果与文献报道^[19]一致。在释放前期,制剂S的释放速度快于制剂M与制剂F,不符合上述微球的释放规律。因此,本文通过对释放过程中微球的形貌观察及PLGA分子量测定,并结合释放曲线及文献报道推测醋酸戈舍瑞林微球的释放机制。

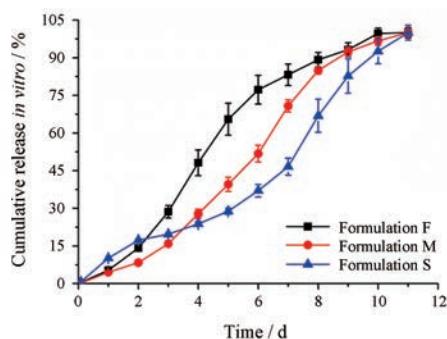


Figure 2 *In vitro* release profiles of the goserelin acetate microspheres using sample-and-separate method at 45 $^\circ\text{C}$ in 5% (v/v) methanol. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 醋酸戈舍瑞林微球释放机制的研究

根据文献^[20]报道,微球的释放过程主要分为3个阶段——突释阶段、扩散阶段和溶蚀阶段。突释阶段:微球表面被润湿,黏附在微球表面的药物溶解到介质中;扩散阶段:微球表面出现一些水性通道,药物通过这些水性通道从微球内部扩散到介质中;溶蚀阶段:PLGA降解速度增加,微球溶蚀,药物快速释放。微球释放过程中分子量测定结果(图3)显示,PLGA分子量呈持续下降趋势,且整个释放过程中,分子量大小始终为制剂F<制剂M<制剂S,说明PLGA的降解,微球溶蚀是微球中药物释放的主要途径。图4为醋酸戈舍瑞林微球制剂F、制剂M和制剂S在释放过程中不同时间点的电镜扫描照片。在释放初期(第1天),制剂S微球表面褶皱较多,不平整。因此,与释放介质接触面积较大,且表面形成了较多的孔洞,这与微球体外释放结果(图2)中释放前期制剂S释放速度快于制剂F和制

剂M是一致的,说明在此阶段扩散作用是微球释放的主要因素。第2天电镜照片显示,微球之间黏连严重,内部孔径增大,不再具有整球形态,体外释放曲线显示释放速度加快,说明此时微球处于溶蚀阶段,PLGA的降解是药物释放的主要途径。

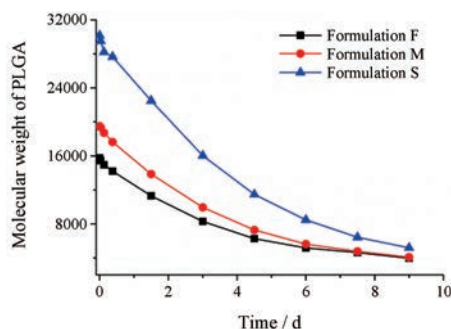


Figure 3 Molecular weight of PLGA of goserelin acetate microspheres during release

4 醋酸戈舍瑞林微球的体内释放特性

4.1 方法学验证

4.1.1 专属性 空白血浆中的内源性物质不干扰戈舍瑞林和戈舍瑞林D-10的测定。

4.1.2 标准曲线 取空白大鼠血浆制备成系列浓度的戈舍瑞林标准样本,按照“体内药代动力学研究中样本前处理”项操作。以戈舍瑞林浓度为横坐标,戈舍瑞林与戈舍瑞林-D10的峰面积比为纵坐标,用加权($w = 1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,求得戈舍瑞林标准曲线方程为 $y = 0.232x + 0.000981$, $r = 0.9990$ 。

4.1.3 准确度和精密度 考察了低、中、高3个浓度的质控样本的精密度和准确度。结果表明,批内、批间精密度RSD在1.25%~9.07%,准确度RE在-2.08%~7.96%,均在可接受范围内。

4.1.4 基质效应 空白基质提取后添加相应浓度标准溶液,以基质存在下的峰面积与不含基质的相应峰面积相比,计算戈舍瑞林的基质效应。低、高水平的基质

效应分别为100.7%和98.9%。

4.1.5 稳定性 观察大鼠血浆样品经过3次冷冻-解冻循环,室温放置3h,在-80℃下放置60天及样品经处理后室温放置10h的稳定性。相对标准偏差绝对值均小于10%,表明大鼠血浆中戈舍瑞林在以上所有条件下均稳定。

4.2 血药浓度-时间曲线

大鼠肌肉注射醋酸戈舍瑞林微球后,其血药浓度-时间曲线见图5。给药后1h内,血浆中戈舍瑞林浓度达到第1次峰值,表现为突释阶段。在该阶段后,制剂S呈明显的双峰,在第1~5天血药浓度高于制剂F和制剂M,这与体外释放曲线前期,制剂S释放速度快于制剂F和制剂M的情况相对应。从达峰时间来看,制剂S的达峰时间最长,制剂M的达峰时间介于S制剂与制剂F之间,体外释放度测定的醋酸戈舍瑞林微球的释放趋势与醋酸戈舍瑞林在SD大鼠体内的释放趋势一致,证明体外释放度方法能很好地反映醋酸戈舍瑞林微球在SD大鼠体内的释放情况。

5 体内外相关性模型的构建

将3种释放速率不同的醋酸戈舍瑞林微球在SD大鼠体内的血药浓度-时间数据经% AUC法进行处理

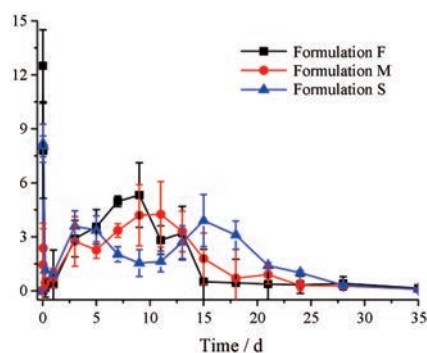


Figure 5 Mean plasma concentration-time profiles of goserelin acetate microspheres in SD rats following intramuscular administration at a single dose of $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

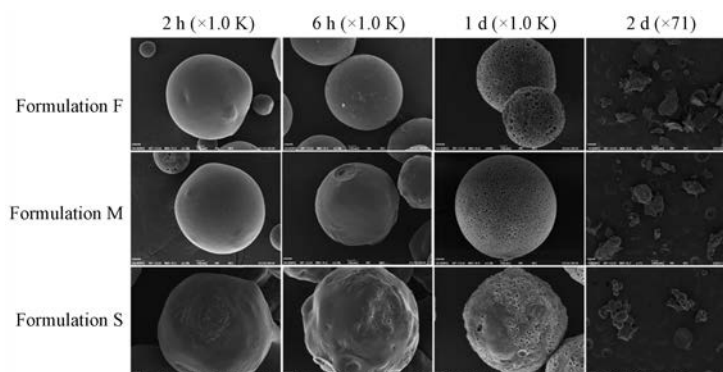


Figure 4 SEM micrographs of the goserelin acetate microsphere during release

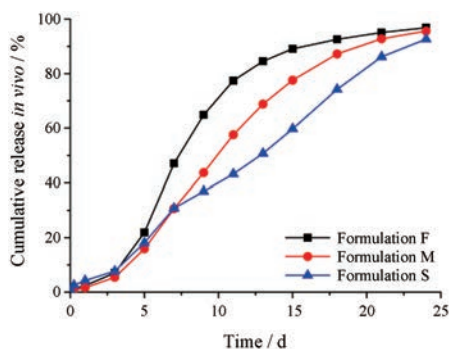


Figure 6 *In vivo* cumulative release profiles of goserelin acetate microspheres with different release rates

后,得到3种微球在SD大鼠体内的累积释放曲线,结果见图6。

选用释放速率不同的3批微球制剂两两组合建立体内相关性模型,即以体外累积释放度为横坐标,以体内累积释放度作为纵坐标,绘制相关性曲线,并用数学公式对相关性曲线进行拟合,结果见图7(A~C),所得的体内相关性方程见表2。结果表明,体外累积释放度与体内累积释放度之间相关性良好($r > 0.98$)。将未参与建模的第3批微球制剂作为外部预测能力验证批次,将其体外累积释放曲线代入体内相关性模型计算得到体内累积释放曲线,并与其在大鼠体内的

实际累积释放曲线进行比较,结果见图7(D~F)。由图显示,预测得到的体内累积释放曲线与实测得到的体内累积释放曲线基本重合,证明本研究所建立的体内相关性模型在大鼠体内具有良好的预测能力。

结论

本研究采用复乳法(S/O/W法)制备了3种释放速率不同的注射用醋酸戈舍瑞林微球。结合醋酸戈舍瑞林微球在体内外的释放情况及释放过程中PLGA分子量和形貌的研究,推测其具有3个释放阶段,即:突释阶段,微球表面的药物溶解释放;扩散阶段,微球内部药物扩散至微球表面后释放;溶蚀阶段(主要阶段),随着PLGA的降解,药物在聚合物溶蚀和扩散的双重作用下完全释放。本文所开发的体外释放度测定方法对不同的醋酸戈舍瑞林微球具有良好的区分能力。文中选择不同的建模批次微球建立IVIVC,均相关性良好($r > 0.98$),外部预测能力验证结果表明,所建立的IVIVC方程在大鼠体内具有良好的预测能力。醋酸戈舍瑞林微球IVIVC的建立,证明本研究所开发体外释放度测定方法可以很好地预测醋酸戈舍瑞林微球在大鼠体内的释药行为,并且可用于体外释放度方法限度的制定,同时可指导处方筛选,加快醋酸戈舍瑞林微球制剂的开发进程。

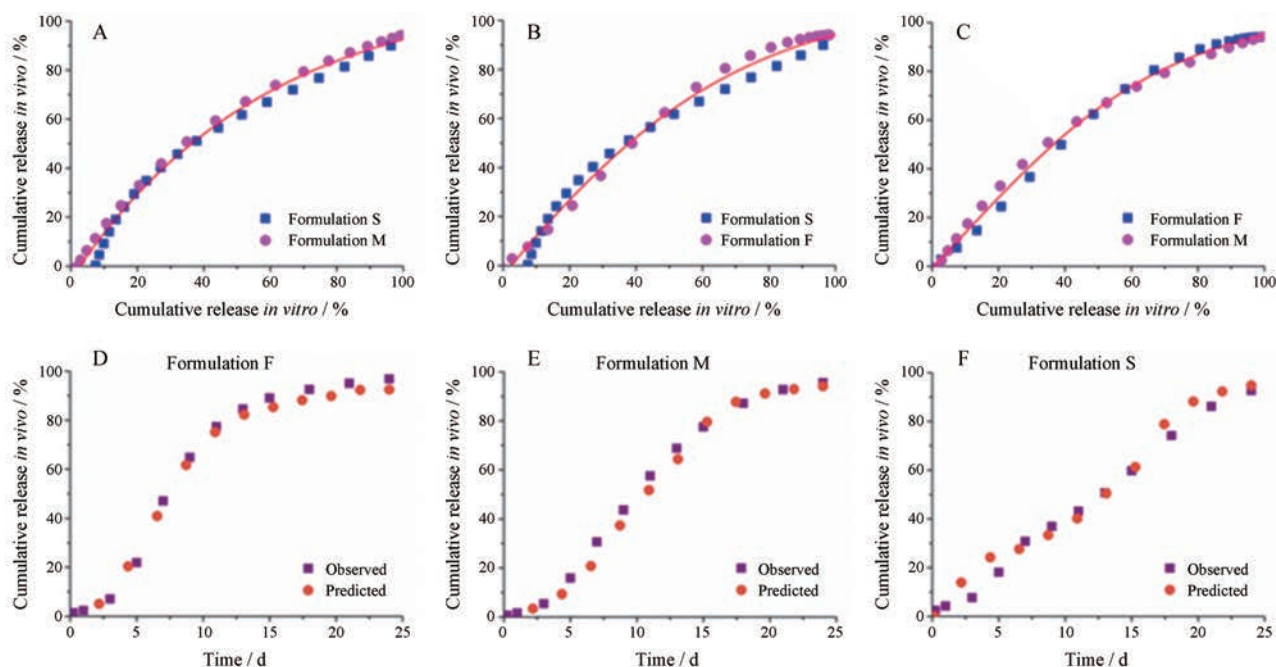


Figure 7 *In vitro-in vivo* correlation (IVIVC) developed for goserelin acetate microspheres. A: IVIVC developed using Formulation S and M; B: IVIVC developed using Formulation S and F; C: IVIVC developed using Formulation F and M; D: Observed and predicted *in vivo* release profiles of formulation F; E: Observed and predicted *in vivo* release profiles of formulation M; F: Observed and predicted *in vivo* release profiles of formulation S

Table 2 IVIVC equations and their correlation coefficients established using different microspheres formulation

Establishment	Validation	Equation	r
S/M	F	$y = 113.90 + 18041.46 / \{1 + \exp[(x - 290.66) / 57.98]\}$	0.991 9
S/F	M	$y = 109.15 - 255.50 / \{1 + \exp[(x + 9.13) / 3.930]\}$	0.989 7
F/M	S	$y = 105.07 - 270.53 / \{1 - \exp[(x - 8.27) / 32.19]\}$	0.996 1

References

- [1] Hickey T, Kreutzer D, Burgess DJ, et al. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices [J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 1649-1656.
- [2] D'Souza SS, Deluca PP. Development of a dialysis *in vitro* release method for biodegradable microspheres [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2005, 6: E323-E328.
- [3] Andhariya JV, Shen J, Choi S, et al. Development of *in vitro-in vivo* correlation of parenteral naltrexone loaded polymeric microspheres [J]. *J Control Release*, 2017, 255: 27-35.
- [4] Rawat A, Bhardwaj U, Burgess DJ. Comparison of *in vitro-in vivo* release of Risperdal® Consta® microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2012, 434: 115-121.
- [5] Shen J, Burgess DJ. Accelerated *in vitro* release testing methods for extended-release parenteral dosage forms [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 986-996.
- [6] Shen J, Choi S, Qu W, et al. *In vitro-in vivo* correlation of parenteral risperidone polymeric microspheres [J]. *J Control Release*, 2015, 218: 2-12.
- [7] Burgess DJ, Crommelin DJ, Hussain AS, et al. Assuring quality and performance of sustained and controlled released parenterals [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 21: 679-690.
- [8] Zhao YQ, Zhou SH, Liu WJ, et al. Discussion of development and validation of dissolution methods for solid oral dosage forms [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 202-209.
- [9] FDA: guidance for industry extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of *in vitro/in vivo* correlation [EB/OL]. US: Department of Human Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1997 [2018-08-30]. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- [10] Shen J, Burgess DJ. *In vitro-in vivo* correlation for complex non-oral drug products: where do we stand? [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 644-651.
- [11] Suarez-Sharp S, Li M, Duan J, et al. Regulatory experience with *in vivo-in vitro*, correlations (IVIVC) in new drug applications [J]. *AAPS J*, 2016, 18: 1379-1390.
- [12] Roudier B, Davit BM, Beyssac E, et al. *In vitro-in vivo* correlation's dissolution limits setting [J]. *Pharm Res*, 2014, 31: 2529-2538.
- [13] Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of *in vivo-in vitro* release of dexamethasone from PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2008, 127: 137-145.
- [14] Zhang S, Han JB, Leng GY, et al. An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of goserelin and testosterone in rat plasma for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 965: 183-189.
- [15] D'Souza S, Faraj JA, Giovagnoli S, et al. IVIVC from long acting olanzapine microspheres [J]. *Int J Biomater*, 2014, 2014: 407065.
- [16] Chu DF, Fu XQ, Liu WH, et al. Pharmacokinetics and *in vitro* and *in vivo* correlation of huperzine A loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres in dogs [J]. *Int J Pharm*, 2006, 325: 116-123.
- [17] Lai HQ, Hu Y, Li XD. The *in vitro* dissolution of total composition of the tablet of rhizomes of ligusticum chuanxiong components and *in vitro-in vivo* correlation by the method of area under the absorbance-wavelength curve [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 788-792.
- [18] Trelstar®: depot, clinical pharmacology and biopharmaceutics review for NDA [EB/OL]. US: Department of Human Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2000 [2018-08-30]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/20-715_Trelstar_biopharmr_P1.pdf.
- [19] Gao KP, Chen QH. Research of method for accelerated *in vitro* drug release from poly-ester microsphere injection [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2009, 18: 614-617.
- [20] Somayaji MR, Das D, Przekwas A. A new level a type IVIVC for the rational design of clinical trials toward regulatory approval of generic polymeric long-acting injectables [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2016, 55: 1179-1190.